



<b>(51) 国際特許分類6</b> C12N 5/10, 15/62, C07K 19/00, 14/715, 14/72	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO97/32971</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 1997年9月12日(12.09.97)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP97/00687  <b>(22) 国際出願日</b> 1997年3月5日(05.03.97)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平8/47796 1996年3月5日(05.03.96) JP  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 株式会社 ディナベック研究所 (DNAVEC RESEARCH INC.)(JP/JP) 〒305 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 Ibaraki, (JP) <b>(72) 発明者 ; および</b> <b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b> 小澤敬也(OZAWA, Keiya)(JP/JP) 〒329-04 栃木県河内郡南河内町祇園3-1-3 C-201 Tochigi, (JP) 伊藤克久(ITO, Katsuhisa)(JP/JP) 坂田恒昭(SAKATA, Tsuneaki)(JP/JP) 上田泰次(UEDA, Yasuji)(JP/JP) 長谷川護(HASEGAWA, Mamoru)(JP/JP) 〒305 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社 ディナベック研究所内 Ibaraki, (JP)	<b>(74) 代理人</b> 弁理士 清水初志(SHIMIZU, Hatsushi) 〒300 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)  <b>(81) 指定国</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ARIPO特許 (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  添付公開書類 国際調査報告書	
<b>(54)Title: GENE THAT IMPARTS SELECTIVE PROLIFERATIVE ACTIVITY</b>  <b>(54)発明の名称</b> 選択的増殖性を付与する遺伝子  <b>(57) Abstract</b> It has become possible to amplify cells selectively by introducing thereinto a gene coding for a fusion protein containing (a) a region to which a ligand binds, (b) a region which causes association when a ligand binds to the region (a) and (c) a region which imparts the cells a proliferative activity when the association occurs, and giving the cells ligand stimulation.		

(57) 要約

(a) リガンドが結合する領域、(b) (a) の領域にリガンドが結合すると  
会合する領域、及び(c) 会合すると細胞に増殖活性を付与する領域、を含む融  
合タンパク質をコードする遺伝子を細胞に導入し、該細胞にリガンド刺激を与え  
ることにより、該細胞を選択的に増幅させることが可能となった。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	ES	スペイン	LS	レソト	RS	スーダン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AU	オーストラリア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
AZ	アゼルバイジャン	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BB	バルバドス	GE	グルジア	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BE	ベルギー	GR	ギリシャ	MD	モルドバ	SN	セネガル
BG	ブルガリア	GU	グアム	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BJ	ベナン	HN	ホンジュラス	MK	マケドニア	TD	チャド
BR	ブラジル	IE	アイルランド	ML	マリ	TG	トーゴ
BY	ベラルーシ	IT	イタリア	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	JP	日本	MR	モリタニア	TR	トルコ
CF	中央アフリカ共和国	KE	ケニア	MW	モザンビーク	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	KR	韓国	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CH	スイス	LI	リヒテンシュタイン	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	LK	スリランカ	NL	オランダ	US	米国
CM	カメルーン			NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CN	中国			NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム
CZ	チェコ共和国			PL	ポーランド	YU	ユーゴスラビア
DE	ドイツ			PT	ポルトガル		
DK	デンマーク			RO	ルーマニア		

## 明細書

### 選択的増殖性を付与する遺伝子

#### 技術分野

本発明は、遺伝子工学分野、特に遺伝子治療の分野に関する。

#### 背景技術

先天的又は後天的に遺伝子に欠陥があるために発症する病気、即ち、遺伝子疾患に対しては、これまで様々な治療法が考えられてきた。その一つとして、欠陥遺伝子そのものを正常な遺伝子と入れ換えたり、正常な遺伝子を補ったりすることにより、遺伝子疾患を根本的に解決しようとするのが、遺伝子治療である。この遺伝子治療に当たって重要なことは、正常な遺伝子を標的細胞に正確に導入すると共に、導入した遺伝子を正確に発現させることである。正常な遺伝子を標的細胞に導入するための遺伝子のベクターとしては、これまで、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター等のウイルスベクターや、リボソーム等に代表される非ウイルスベクターが用いられてきた。しかし、いずれも標的細胞への遺伝子の導入効率が低い等の欠点が存在した。また、導入された遺伝子の発現効率が悪い等の欠点もあったため治療に不十分な場合が多かった。この場合でも、アデノシンデアミナーゼ（ADA）欠損症のように、正常ADA遺伝子が導入された細胞が生存優位性（survival advantage）あるいは増殖優位性（growth advantage）を獲得し、体内で次第に選択され優位になっていくものと期待されるものであれば、たとえ遺伝子導入効率が低くても次第に治療効果が現れるようになっていく可能性がある。しかし、このような体内での選択性が期待できないタイプの治療用遺伝子を導入する必要がある場合も多く、遺伝子を導入した細胞を選択的に増幅させるシステムの確立が望まれていた。

ところで、G-CSFは、好中球を選択的に増殖させるサイトカイン（造血因子）として従来から考えられてきたが、近年、G-CSFを投与すると、好中球の増加がみられるばかりでなく、造血幹細胞／前駆細胞の体内プールの増加がみられることが

報告された（臨床血液., 35, 1080(1994)）。また、G-CSFが機能する機構として、G-CSF刺激によりG-CSF受容体が活性化されるときには、G-CSF受容体の二量体化がみられること（Proc Growth Factor Res., 3(2), 131-141(1991)）や、G-CSF受容体には、増殖誘導ドメインと分化誘導ドメインが存在することが報告された（Cell., 74, 1079-1087(1993)）。さらに、G-CSF受容体同様、二量体化により活性化する受容体としては、エストロゲン受容体が知られており（J Biol Chem., 264, 2397-2400(1989)）、細胞内でエストロゲン受容体とc-Ablチロシンキナーゼの融合タンパク質を発現させることによりc-Ablチロシンキナーゼの活性化が起こることも報告された（The EMBO Journal., 12, 2809-2819(1993)）。

#### 発明の開示

本発明は、治療用遺伝子を導入した造血幹細胞等を体内あるいは体外で選択的に増幅させることにより、遺伝子導入効率が低いという問題点を克服することを狙ったもので、造血幹細胞等を標的とした遺伝子治療の基盤技術を提供することを目的とする。

現在、遺伝子治療の分野においては、標的細胞への遺伝子の導入効率及び導入された遺伝子の発現効率の面で克服すべき課題が多い。従って、遺伝子導入がなされた標的細胞のみを選択的に増殖させるシステムが確立されれば、大きな飛躍がもたらされることは、明らかである。特に、赤血球、白血球など多くの血液細胞の基となる細胞であり、遺伝子治療の標的細胞として最も好ましいとされる造血幹細胞に対し、かかるシステムが確立されれば、遺伝子治療の分野における貢献度は、非常に大きい。

本発明者らは、好中球を選択的に増殖させるサイトカイン（造血因子）として従来から考えられてきたG-CSFが、造血幹細胞の増殖をも引き起こし、このG-CSF受容体が活性化される際に、G-CSF受容体の二量体化がみられることに鑑み、遺伝子工学的手法を用いて工夫したG-CSF受容体の二量体化により、造血幹細胞を増殖させるシステムを想到した。また、エストロゲン刺激によりエストロゲン受容体が二量体化するという事に鑑み、G-CSF受容体遺伝子とエストロゲン受容体遺伝子のキメラ遺伝子を作製し、そのキメラ遺伝子を導入した細胞に対して外部から

エストロゲン刺激を与えることにより、強制的にキメラ遺伝子産物中のG-CSF受容体部分を二量体化させることを想到した。

即ち、本発明者らは、外部からのエストロゲン刺激により、キメラ遺伝子産物中のG-CSF受容体部分の活性化を引き起こし、遺伝子を導入した造血幹細胞を選択的に増殖させるシステムを新規に開発し、これを遺伝子治療の分野に応用すべく本発明を完成した。

本発明は、リガンドが結合する領域、該領域にリガンドが結合すると会合する領域、及び、会合すると細胞に増殖活性を付与する領域、とを含む融合タンパク質、該融合タンパク質をコードする遺伝子を含むベクター、該ベクターを含む細胞及びステロイドホルモンを作用させることにより該細胞を体内ないし体外で選択的に増殖させる方法等に関する。また、本発明は、該ベクターが外来遺伝子を含む場合は、該外来遺伝子が導入された細胞を選択的に増殖させる方法等に関する。

より具体的には、

- (1) (a) リガンドが結合する領域、(b) (a) の領域にリガンドが結合すると会合する領域、及び(c) サイトカイン受容体又はその一部からなり、会合すると細胞に増殖活性を付与する領域、を含む融合タンパク質、
- (2) 「サイトカイン受容体又はその一部からなり、会合すると細胞に増殖活性を付与する領域」が、G-CSF受容体に由来する、(1) 記載の融合タンパク質、
- (3) 「リガンドが結合する領域」がステロイドホルモン受容体に由来する、(1) 記載の融合タンパク質、
- (4) ステロイドホルモン受容体がエストロゲン受容体である、(3) 記載の融合タンパク質、
- (5) (1) 記載の融合タンパク質をコードする遺伝子を含むベクター、
- (6) (5) 記載のベクターを保持する細胞、
- (7) (6) 記載の細胞に対して、(1) 記載の融合タンパク質の「リガンドが結合するドメイン」に作用するリガンドを作用させて、(6) 記載の細胞を選択的に増殖させる方法、
- (8) (a) リガンドが結合する領域、(b) (a) の領域にリガンドが結合する

と会合する領域、及び(c)会合すると細胞に増殖活性を付与する領域、とを含む融合タンパク質をコードする遺伝子と所望の外来遺伝子、を含むベクター、

(9) 「会合すると細胞に増殖活性を付与する領域」がサイトカイン受容体に由来する、(8)記載のベクター、

(10) サイトカイン受容体がG-CSF受容体である(9)記載のベクター、

(11) 「リガンドが結合する領域」がステロイドホルモン受容体に由来する、(8)記載のベクター、

(12) ステロイドホルモン受容体がエストロゲン受容体である(11)記載のベクター、

(13) 「融合タンパク質をコードする遺伝子」と「外来遺伝子」とが同一の分子上に位置している(8)記載のベクター、

(14) 「融合タンパク質をコードする遺伝子」と「外来遺伝子」とが別々の分子上に位置している(8)記載のベクター、

(15) (8)～(14)のいずれかに記載のベクターを保持する細胞、

(16) (15)記載の細胞に対して、(8)記載のベクターに含まれる遺伝子がコードする融合タンパク質の「リガンドが結合するドメイン」に作用するリガンドを作用させて、(15)に記載の細胞を選択的に増殖させる方法、

(17) (a) (5)または(8)に記載のベクター、及び(b)該ベクターに含まれる遺伝子がコードする融合タンパク質の「リガンドが結合するドメイン」に作用するリガンド、を含むキット、  
に関する。

本発明に用いられるリガンドは、特定のタンパク質に作用することにより該タンパク質を会合せしめるものであれば、特に制限はないが、ステロイドホルモンが好適である。ステロイドホルモンとしては、例えば、エストロゲン、アンドロゲン、プロゲステロン、グルココルチコイド、ミネラルコルチコイドなどが挙げられ、それぞれの受容体タンパク質との組み合わせで用いられる。また、本発明に用いられるサイトカイン受容体は、会合することによって細胞に増殖活性を付与するものであればよく、例えば、G-CSFなどサイトカイン受容体ファミリーに属するものや、c-kitやflk2/flt3などのようにチロシンキナーゼ受容体ファミリー

に属するもの等がある。

本発明の融合タンパク質における「細胞に増殖活性を付与する領域」としては、細胞内増殖シグナルを伝える分子、例えば、サイトカイン受容体分子全体を用いることが可能であるが、分子中の細胞に増殖活性を付与する領域のみを用いることも可能である。この場合、融合タンパク質遺伝子が導入された細胞の分化を起こさず増殖のみを起こすので、該細胞をそのままの形で増殖させる際に有利である。さらに、本発明において用いられるベクターには、融合タンパク質をコードする遺伝子を含む単一種分子のベクター、融合タンパク質と外来遺伝子の双方を含む単一種分子のベクターの他、融合タンパク質をコードする遺伝子を含むベクターと外来遺伝子を含むベクターの組み合わせからなる複数種の分子からなるベクター系、例えば、バイナリーベクター系も含まれる。この複数種の分子からなるベクター系は通常、共形質転換 (co-transformation) によって細胞に導入される。

なお、融合タンパク質をコードする遺伝子と外来遺伝子とを同一のベクターに挿入する場合には、IRES (internal ribosome entry site) (特表平6-509713号公報) を含むジシストロニックの形にすることができる。例えば、「5' -プロモーター - 外来遺伝子 - IRES - 融合タンパク質をコードする遺伝子 - 3'」の構成を有するベクター、又は、「5' -プロモーター - 融合タンパク質をコードする遺伝子 - IRES - 外来遺伝子 - 3'」の構成を有するベクターを用いることができる。該融合タンパク質遺伝子を発現している細胞のほぼ全てが外来遺伝子を発現しているようにするには、前者の形が一般に用いられる。

また、本発明において、ベクターの導入される細胞としては、造血幹細胞、リンパ系細胞、これら血球系以外の細胞などが挙げられる。特に、本発明は、自己複製能を有する造血幹細胞に好適に適用される。なお、本発明において細胞に導入される外来遺伝子については、特に制限はないが、遺伝子治療の分野においては、欠陥遺伝子に対応する正常な遺伝子を用いるのが有効である。

#### 図面の簡単な説明

図1の(A)は、G-CSF受容体とエストロゲン受容体のキメラ分子 (GCRER) を示す

。(B)は、G-CSF受容体とエストロゲン受容体のキメラ分子のうち、G-CSF受容体の5番目から195番目のアミノ酸が欠失した変異体 (GCR $\Delta$ (5-195)/ER) を示す。(C)は、G-CSF受容体とエストロゲン受容体のキメラ分子のうち、G-CSF受容体の5番目から195番目及び725番目から756番目のアミノ酸が欠失した変異体 (GCR $\Delta$ (5-195, 725-756)/ER) を示す。

図2は、G-CSF受容体とエストロゲン受容体のキメラ遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクター「pMX」を示す図である。

図3は、「pCMX-GCRER」を用いて形質転換したBa/F3細胞の増殖を経時的に示す図である。

図4は、「pCMX-GCRER」を用いて形質転換したBa/F3細胞に対し、様々な濃度のエストロジオール刺激を与えた後の、Ba/F3細胞の増殖を経時的に示す図である。

図5は、「pCMX-GCR $\Delta$ (5-195)/ER」を用いて形質転換したBa/F3細胞の増殖を経時的に示す図である。

図6は、プラスミド「pCMX-GCRER-IRES-CD24」を示す図である。

図7は、プラスミド「pCMX-GCR $\Delta$ (5-195)/ER-IRES-CD24」を示す図である。

図8は、プラスミド「pCMX-GCR $\Delta$ (5-195, 725-756)/ER-IRES-CD24」を示す図である。

図9は、「pCMX-GCR $\Delta$ (5-195)/ER-IRES-CD24」を導入したBa/F3細胞におけるCD24の発現をフローサイトメトリーにより検出した図である。上は、「pCMX-GCR $\Delta$ (5-195)/ER-IRES-CD24」を導入したBa/F3細胞での結果を示し、下は対照として用いた「pCMX-GCR $\Delta$ (5-195)/ER」を導入したBa/F3細胞での結果を示す（なお、死細胞検出のために用いたヨウ化プロピディウムからのシグナルもデータに含まれている）。

図10は、「vMXGCRER」が導入された骨髓細胞により構成された顆粒球-マクロファージ系コロニーを示す顕微鏡写真である。

図11は、「vMXGCR $\Delta$ (5-195)/ER」が導入された骨髓細胞により構成された赤芽球系コロニーを示す顕微鏡写真である。

図12は、「vMXGCRER」が導入された骨髓細胞より分化したマクロファージをライトギムザ染色した顕微鏡写真である。



図13は、「vMXGCR $\Delta$ (5-195)/ER」が導入された骨髓細胞より分化した赤芽球をライトギムザ染色した顕微鏡写真である。

#### 発明を実施するための最良の形態

〔実施例1〕 選択的増幅遺伝子であるG-CSF受容体/エストロゲン受容体キメラ遺伝子の作製

G-CSF受容体全体とエストロゲン受容体のリガンド（エストロゲン）結合領域のキメラタンパク質（以下、単に「GCRER」と称する）が産生されるように、それぞれのタンパク質をコードするcDNAの融合遺伝子を作製した（図1(A)）。次いで、G-CSFに対する反応性を欠いたキメラタンパク質を産生するために、「GCRER」に対応する融合遺伝子のうちG-CSF受容体の細胞外ドメインの5番目のGluから195番目のLeuまでの部分を除いた変異誘導体（以下、単に「GCR $\Delta$ (5-195)/ER」と称する）を作製した（図1(B)）。さらに該変異誘導体から、G-CSF受容体の分化誘導ドメイン(725~756)を含んだ部分を除いた変異誘導体（以下、単に「GCR $\Delta$ (5-195,725-756)/ER」と称する）を作製した（図1(C)）。

〔実施例2〕 選択的増幅遺伝子であるG-CSF受容体/エストロゲン受容体キメラ遺伝子が導入されたBa/F3細胞の単離

実施例1で作製した3種類の選択的増幅遺伝子をプラスミド「pCMX」（Cancer Res. 56: 4164(1996)）に組み込んで作成したプラスミド10 $\mu$ gを、ScaIにて直線化したプラストサイジン耐性遺伝子を有する「pSV2bsr」（科研製薬社製）1 $\mu$ gとともに、IL-3依存性細胞株であるBa/F3細胞に電気穿孔法にて導入した。次いで、電気穿孔施行後の細胞を5 $\times$ 10<sup>5</sup>個ずつ24ウェルプレートに分配し、プラストサイジン10 $\mu$ g/mlを含む培地で培養した。この結果、「pCMX-GCRER」を導入した場合は、17ウェル中11ウェルで、「pCMX-GCR $\Delta$ (5-195)/ER」の場合は、29ウェル中3ウェルで、「pCMX-GCR $\Delta$ (5-195,725-756)/ER」では、52ウェル中52ウェルで、プラストサイジン耐性の細胞増殖がみられた。次いで、これらプラストサイジン耐性の細胞をウェルごとにIL-3で増殖させた後、IL-3の代わりにエストラジオール10<sup>-7</sup>Mを加えて培養を行ったところ、「pCMX-GCRER」を導入した場合は、11ウェル中7ウェルで、「pCMX-GCR $\Delta$ (5-195)/ER」の場合は、3ウェル中3ウェルで、「pCM

X-GCR $\Delta$ (5-195,725-756)/ER」の場合は、16ウェル中13ウェルで、IL-3非依存性・エストロゲン依存性の細胞増殖がみられた。なお、「pCMX-GCRER」の代わりにレトロウイルスベクターである「pMX」(Exp. Hematol. 24: 324(1996))に「GCRE R」を挿入したもの(以下、単に「pMX-GCRER」と称する)(図2)を用いて同様の実験を行ったところ、各1細胞を含む24ウェル中2ウェルで、IL-3非依存性・エストロゲン依存性の細胞増殖がみられた。また、「pCMX-GCRER」を導入した細胞に対し、エストラジオールに代えて、1nMのG-CSFを加えたところ、G-CSFで増殖のあるウェルは、エストラジオールで増殖のあるウェルと一致した。さらに、プラスミド未導入のBa/F3細胞をコントロールとして用いたところ、G-CSF及びエストラジオールによる増殖は認められなかった。なお、目的の融合タンパク質が細胞内で生産されていることは、抗G-CSF受容体抗体又は抗エストロゲン受容体抗体を用いたウエスタンブロッティング法により確認した。

#### [実施例3] エストラジオールによる細胞増殖の解析

実施例2で限界希釈法にて得たクローンのうち、エストラジオールに対する反応性の良いものを選択し、以下の実験(XTTアッセイ)に用いた。

まず、「pCMX-GCRER」を導入したBa/F3細胞にて検討を行った。この結果、G-CSF及びエストラジオール刺激にて、IL-3非依存性の細胞増殖が認められた(図3)。さらに、エストラジオール濃度を $10^{-14}$ ~ $10^{-7}$ Mの間で変化させて同様の実験を行ったところ、 $10^{-9}$ ~ $10^{-7}$ Mの間で細胞増殖が認められた(図4)。これにより、 $10^{-9}$ ~ $10^{-7}$ Mの間の濃度によるエストラジオール刺激により、細胞増殖シグナルが伝達されることが示唆された。

次いで、「pCMX-GCR $\Delta$ (5-195)/ER」を導入したBa/F3細胞にて検討をおこなった。この結果、G-CSF刺激による細胞増殖はブロックされ、エストラジオール刺激によってのみ細胞増殖が認められた(図5)。

同様に、「pCMX-GCR $\Delta$ (5-195,725-756)/ER」を導入したBa/F3細胞でも、エストロゲン刺激で細胞増殖が起こり、G-CSFに対する反応性は認められなかった。

#### [実施例4] IRES-CD24発現プラスミドの作成

「pCMX-GCRER」をHindIII, EcoRIで切断し、ベクター断片(「断片1」)を回収した。また、「pCMX-GCRER」および「pCMX-GCR $\Delta$ (5-195)/ER」それぞれから、Hi

ndIIIとKpnI断片（それぞれ「断片2」:1672bp、「断片3」:1099bp）、EcoRIとKpnI断片（それぞれ「断片4」:1888bp、「断片5」:1792bp）を回収した。pBCEC(pBluescriptIIKSにEMCV由来のIRESとCD24を連結したもの, Migita, M., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92: 12075(1995))をApoIにて消化し、IRES-CD24を含む断片（「断片6」:950bp）を回収した。「断片1」、「断片2」、「断片4」、および「断片6」をライゲーションし「pCMXGCRER-IRES-CD24」（図6）を、「断片1」、「断片3」、「断片4」、および「断片6」をライゲーションし「pCMX-GCR $\Delta$ (5-195)/ER-IRES-CD24」（図7）を、「断片1」、「断片3」、「断片5」、「断片6」をライゲーションし「pCMX-GCR $\Delta$ (5-195,725-756)/ER-IRES-CD24」（図8）を構築した。

#### 〔実施例5〕 CD24の細胞内発現

Ba/F3をPBSにて2回、「OPTI-MEMI」（Gibco-BRL社製）にて1回洗浄した10<sup>6</sup>細胞を0.2mlの「OPTI-MEMI」に懸濁し、「pCMX-GCRER-IRES-CD24」、「pCMX-GCR $\Delta$ (5-195)/ER-IRES-CD24」、「pCMX-GCR $\Delta$ (5-195,725-756)/ER-IRES-CD24」をそれぞれ10mgずつ加え、「Gene Pulser」（BioRad社製）を用いて290V、960 $\mu$ Fにて導入した。導入後、2日間10% FCS, 10U/ml mIL-3（R & D SYSTEMS社製）を含むRPMI培地にて培養した。10<sup>6</sup>細胞を5%FCS/PBSにて洗浄後、1mg/ml 抗CD24抗体（Pharming社製）を室温30分反応させ、5%FCS/PBSにて2回洗浄後、1:20希釈したPE標識抗マウス抗体（DAKO社製）を室温30分反応させ、5%FCS/PBSにて2回洗浄した。5mg/ml ヨウ化プロピジウム(propidium iodide)/ PBS 1mlに懸濁し、フローサイトメトリ（Becton Dickinson）にて585nmのディテクターを用いてCD24の発現の解析を行った。この結果、「pCMX-GCR $\Delta$ (5-195)/ER-IRES-CD24」が導入された細胞では、多くの細胞でCD24の発現が検出された。なお、pCMX-GCR $\Delta$ (5-195)/ER-IRES-CD24」が導入された細胞の対照としては「pCMX-GCR $\Delta$ (5-195)/ER」が導入された細胞を用いた。結果を図9 および表1に示す。なお、死細胞検出のために用いたヨウ化プロピジウムからのシグナルもデータ値に含まれている。

表 1

導入プラスミド	抗CD24抗原(-)細胞	抗CD24抗原(+)細胞
pCMX-GCR $\Delta$ (5-195) /ER-IRES-CD24	59.77%	40.23%
pCMX-GCR $\Delta$ (5-195)/ER	85.10%	14.90%

#### [実施例 6] プロジェニターアッセイ

6週齢C57BLマウス4匹に5-フルオロウラシル (5FU: 和光純薬社製) 生理食塩水溶液(10mg/ml)を300ml/匹静脈注射を行った。投与後2日目に、大腿骨より骨髓を採取し、「Lympholyte-M」(Cederlane社製)上にて遠心 (1500rpm、25°C、22分) により単核球を単離した。20%FCS、100U/ml IL6、100mg/mlラットSCFを添加したイスコフ変法ダルベッコ基本培地(IMDM;Gibco社製)にて2日間培養した。CH296 (宝酒造社製、Hanenberg, H. et al.Nature Med. 2: 876(1996)) をコートしたプレート (1146: ファルコン社製) 上にて、IL6とSCFにて前刺激した骨髓細胞 $10^6$ を、エコトロピックパッケージング細胞株「GP+E-86」 (J. Virol. 62: 1120(1988)) に「pMX-GCRER」を組み込み培養上清に得られたレトロウィルス「vMXGCRER」、またはエコトロピックパッケージング細胞株「GP+E-86」に「pMXGCR $\Delta$ (5-195)/ER」を組み込み培養上清に得られたレトロウィルス「vMXGCR $\Delta$ (5-195)/ER」を $10^6$ 含む培養上清で懸濁し、IL6とSCFを添加し培養した。2, 24, 26, 36, 38時間後にウィルス上清を交換した。6回目のウィルス上清交換の24時間後、細胞を $10^4$ /wellになるようにメチルセルロースを含む培地(IMDM, 1.2% メチルセルロース 1500cp;Wako, 20% FCS, 1% 脱イオン化BSA, 10mM 2-メルカプトエタノール,  $10^{-7}$ M b-エストラジオール)にて培養した。10日培養後コロニーを顕微鏡観察した後、塗抹標本を作成しライトギムザ染色後、構成細胞の同定を行った。

この結果、「vMXGCRER」「vMXGCR $\Delta$ (5-195)/ER」が感染した骨髓細胞では、エ

ストラジオール刺激で分化した顆粒球-マクロファージ系コロニー、赤芽球系コロニーが観察された。エストラジオール刺激によって「vMXGCRER」感染骨髓細胞より形成された顆粒球-マクロファージ系コロニーを図10に示す。エストラジオール刺激によって「vMXGCR $\Delta$ (5-195)/ER」感染骨髓細胞より形成された赤芽球系コロニーを図11に示す。これらのコロニーの構成細胞を塗抹標本にしてライトーギムザ染色したところ、分化した血球細胞像が得られた。「vMXGCRER」感染骨髓細胞より形成された顆粒球-マクロファージ系コロニーの塗抹標本で観察されたマクロファージのにしてライトーギムザ染色像を図12に、「vMXGCR $\Delta$ (5-195)/ER」感染骨髓細胞より形成された赤芽球系コロニーの塗抹標本で観察された赤芽球のライトーギムザ染色像を図13に示す。

#### 産業上の利用の可能性

本発明によって、外来遺伝子を導入した細胞を、外部刺激により選択的に増幅させることが可能となり、標的細胞への遺伝子の導入効率などが低い場合であっても、有効な遺伝子治療が行えるようになった。また、本発明における細胞の選択的増幅システムは、様々な血液細胞に適用が可能であるため、遺伝子治療の対象となる細胞の範囲の拡大が図られた。従って、本発明によって、特に遺伝子治療の分野において重要な基盤技術が提供された。

## 請求の範囲

1. (a) リガンドが結合する領域、(b) (a) の領域にリガンドが結合すると会合する領域、及び(c) サイトカイン受容体又はその一部からなり、会合すると細胞に増殖活性を付与する領域、を含む融合タンパク質。
2. 「サイトカイン受容体又はその一部からなり、会合すると細胞に増殖活性を付与する領域」が、G-CSF受容体に由来する、請求項1記載の融合タンパク質。
3. 「リガンドが結合する領域」がステロイドホルモン受容体に由来する、請求項1記載の融合タンパク質。
4. ステロイドホルモン受容体がエストロゲン受容体である、請求項3記載の融合タンパク質。
5. 請求項1記載の融合タンパク質をコードする遺伝子を含むベクター。
6. 請求項5に記載のベクターを保持する細胞。
7. 請求項6に記載の細胞に対して、請求項1記載の融合タンパク質の「リガンドが結合するドメイン」に作用するリガンドを作用させて、請求項6に記載の細胞を選択的に増殖させる方法。
8. (a) リガンドが結合する領域、(b) (a) の領域にリガンドが結合すると会合する領域、及び(c) 会合すると細胞に増殖活性を付与する領域、とを含む融合タンパク質をコードする遺伝子と所望の外来遺伝子、を含むベクター。
9. 「会合すると細胞に増殖活性を付与する領域」がサイトカイン受容体に由来する、請求項8記載のベクター。
10. サイトカイン受容体がG-CSF受容体である請求項9記載のベクター。
11. 「リガンドが結合する領域」がステロイドホルモン受容体に由来する、請求項8記載のベクター。
12. ステロイドホルモン受容体がエストロゲン受容体である請求項11記載のベクター。
13. 「融合タンパク質をコードする遺伝子」と「外来遺伝子」とが同一の分子上に位置している請求項8記載のベクター。
14. 「融合タンパク質をコードする遺伝子」と「外来遺伝子」とが別々の分子

上に位置している請求項 8 記載のベクター。

15. 請求項 8 ～ 14 のいずれかに記載のベクターを保持する細胞。

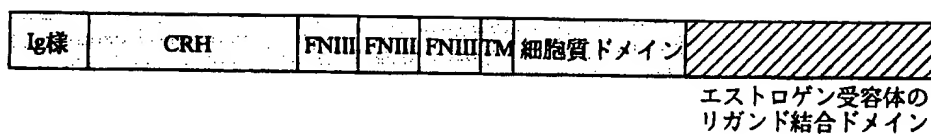
16. 請求項 15 に記載の細胞に対して、請求項 8 記載のベクターに含まれる遺伝子がコードする融合タンパク質の「リガンドが結合するドメイン」に作用するリガンドを作用させて、請求項 15 に記載の細胞を選択的に増殖させる方法。

17. (a) 請求項 5 または 8 に記載のベクター、及び (b) 該ベクターに含まれる遺伝子がコードする融合タンパク質の「リガンドが結合するドメイン」に作用するリガンド、を含むキット。

1 / 13

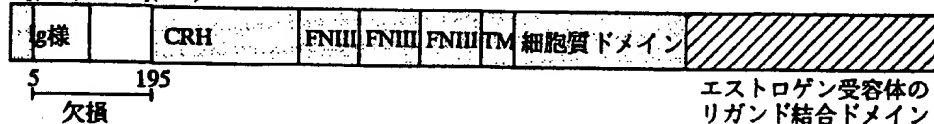
図 1

(A)



(B)

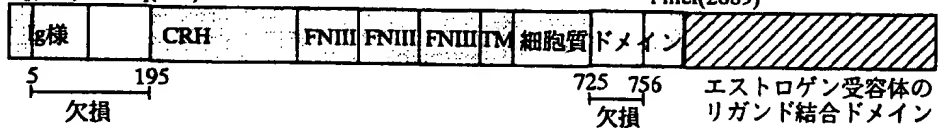
Taq(265) Taq(838)



(C)

Taq(265) Taq(838)

PmeI(2689)

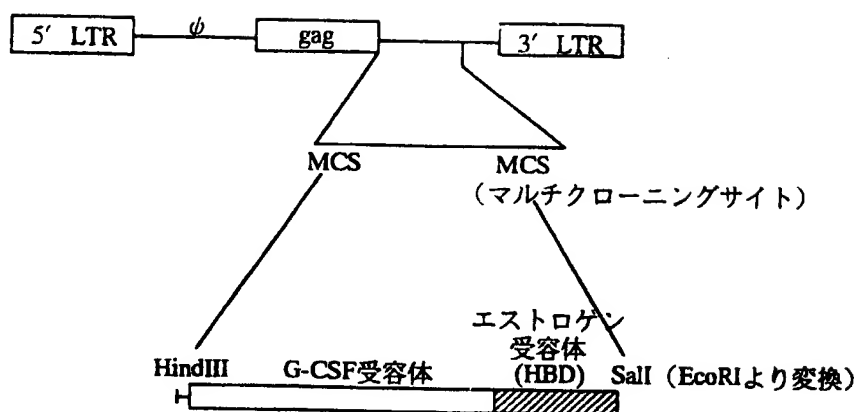




2 / 13

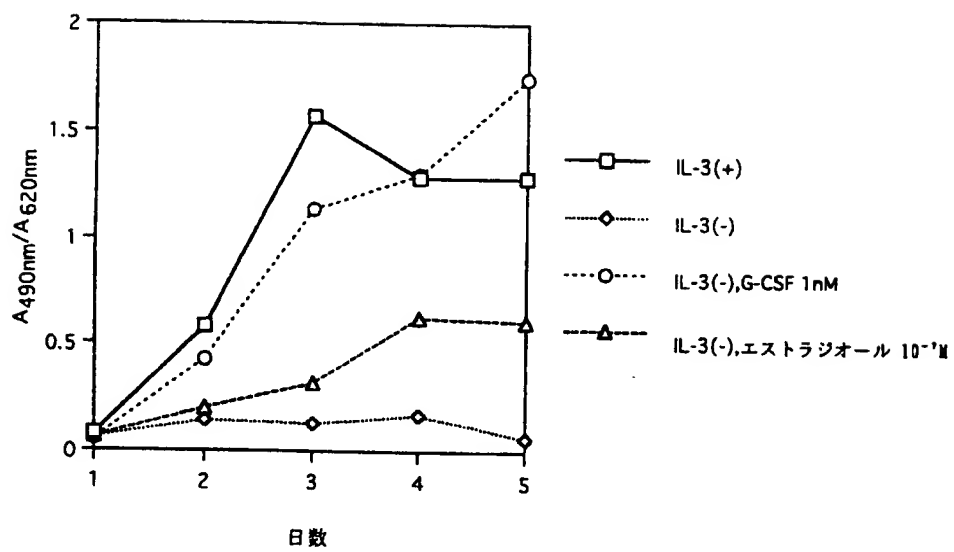
図 2

レトロウイルスベクター (pMX)



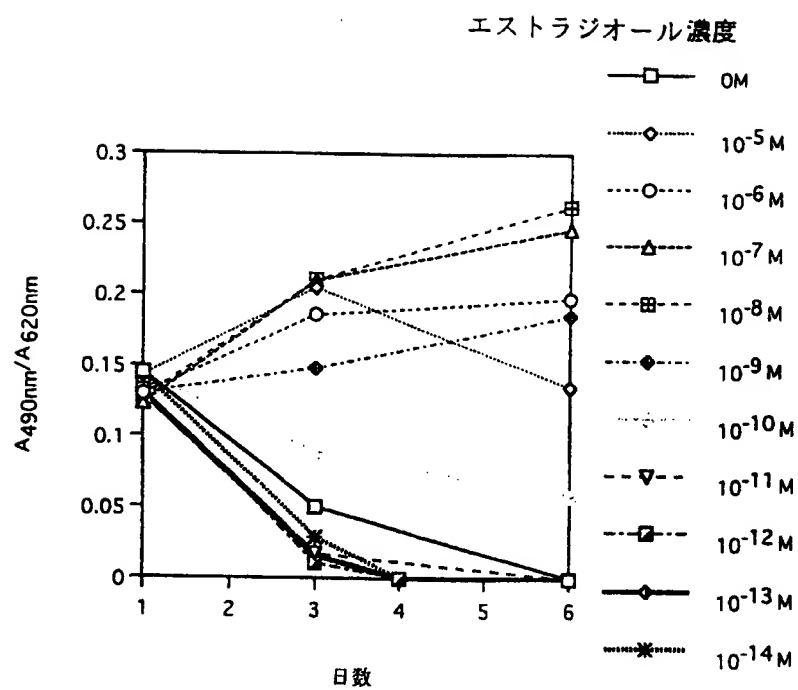
3 / 13

図 3



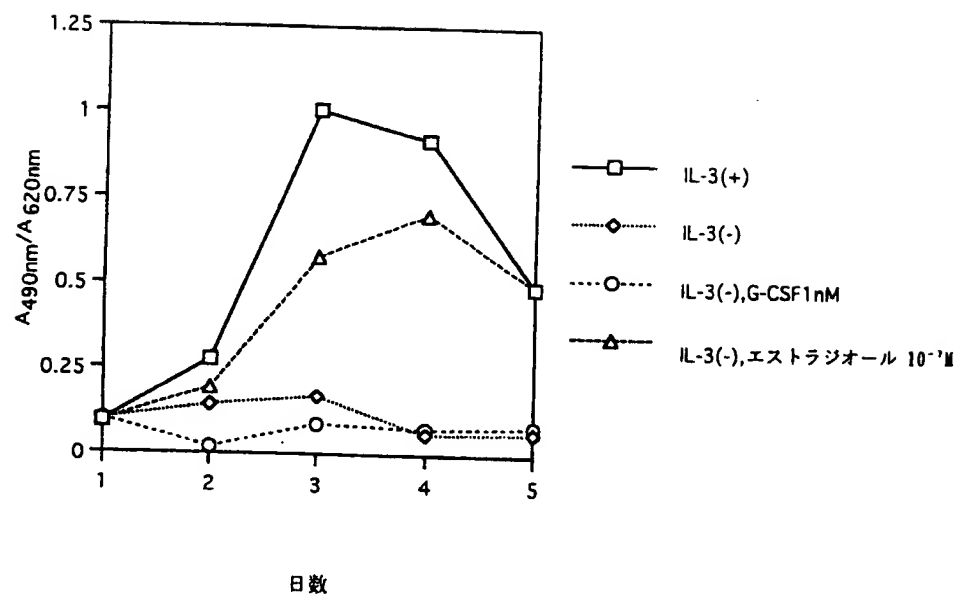
4 / 13

図 4



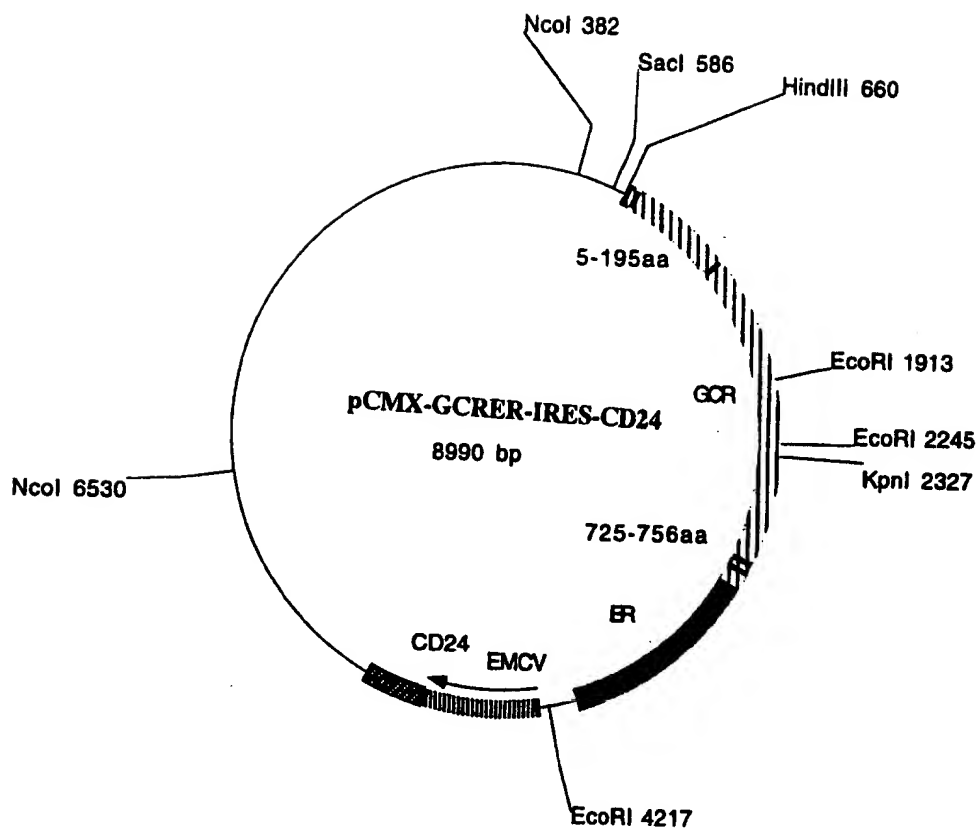
5 / 13

図 5



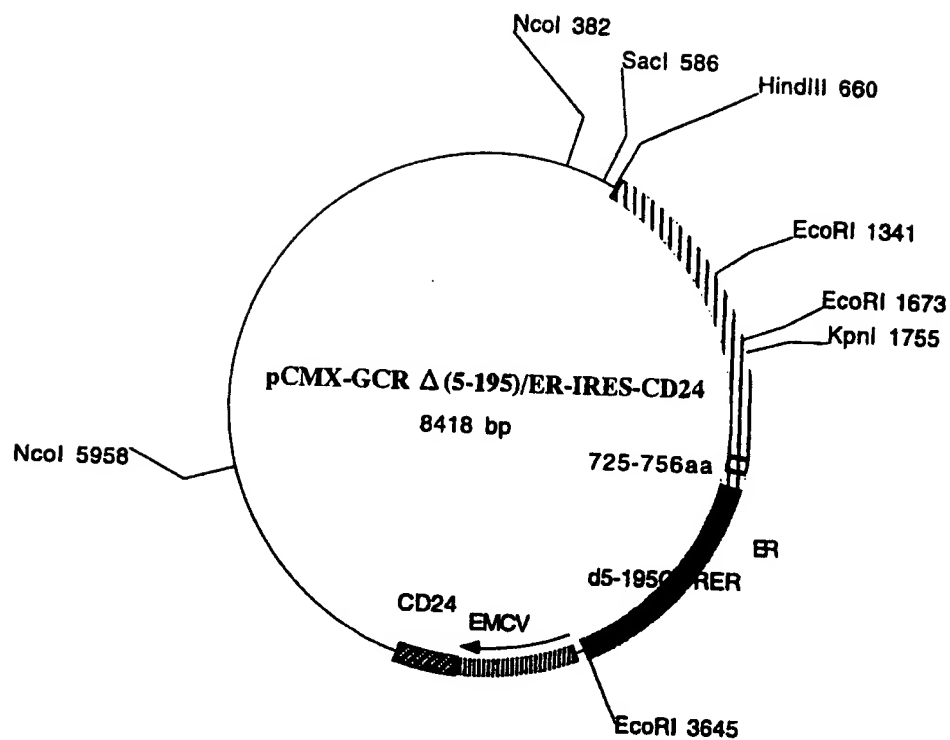
6 / 13

6



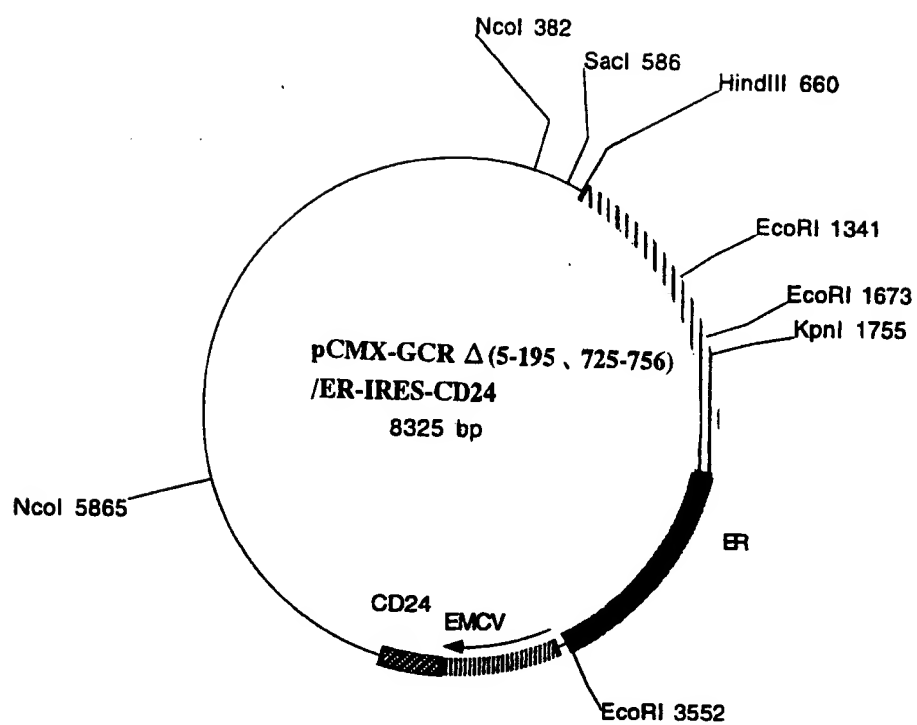
7 / 13

图 7



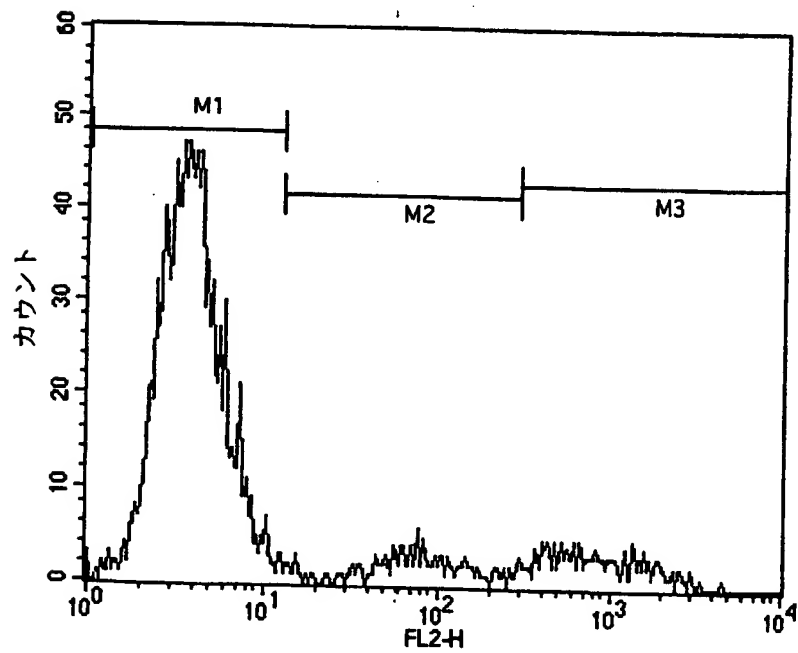
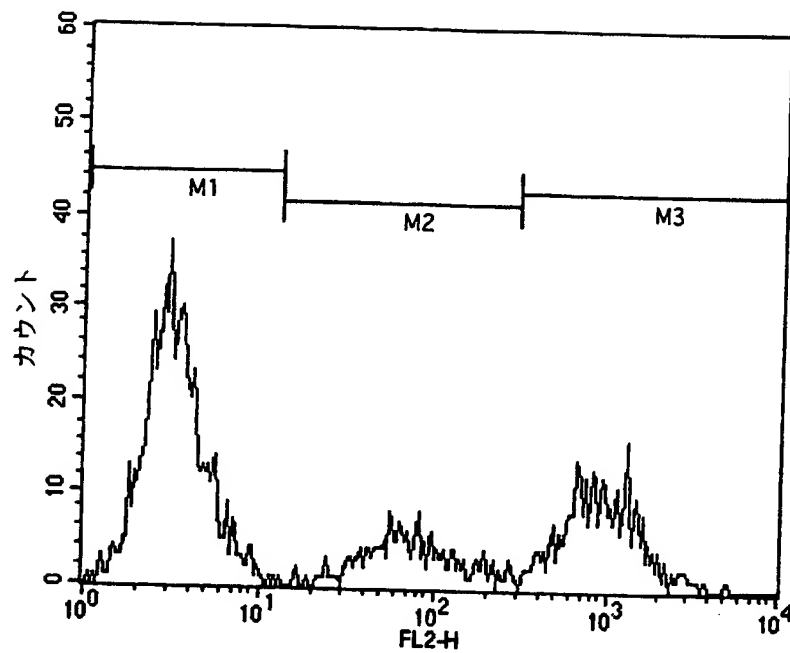
8 / 13

8



9 / 13

図 9





10/13

図 10



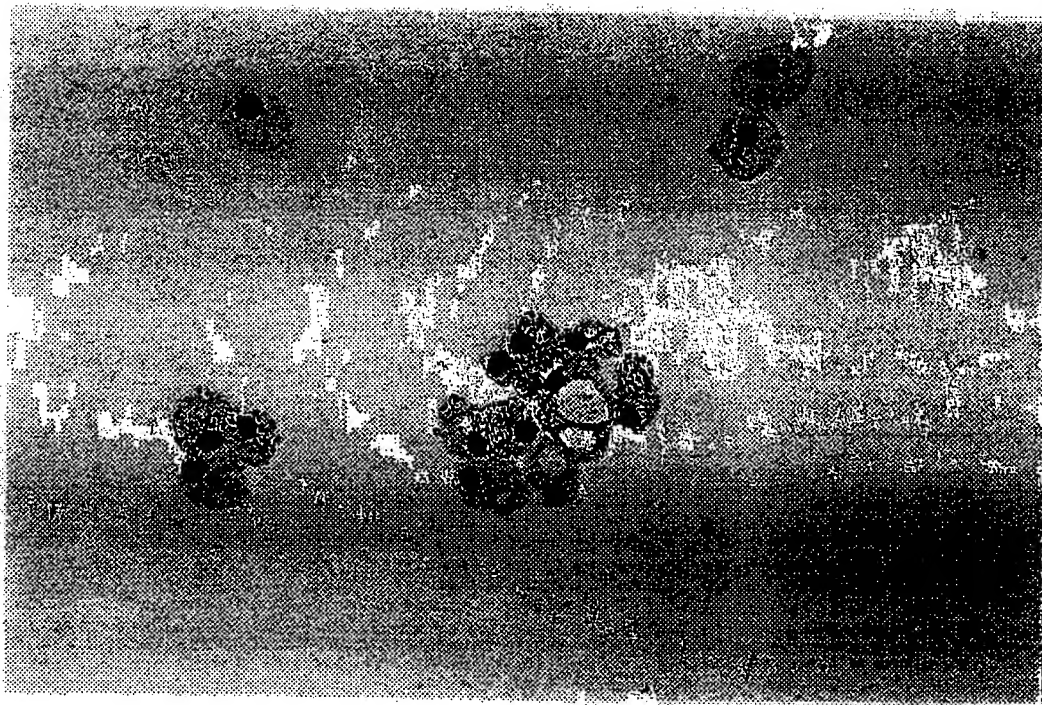
11/13

図 11



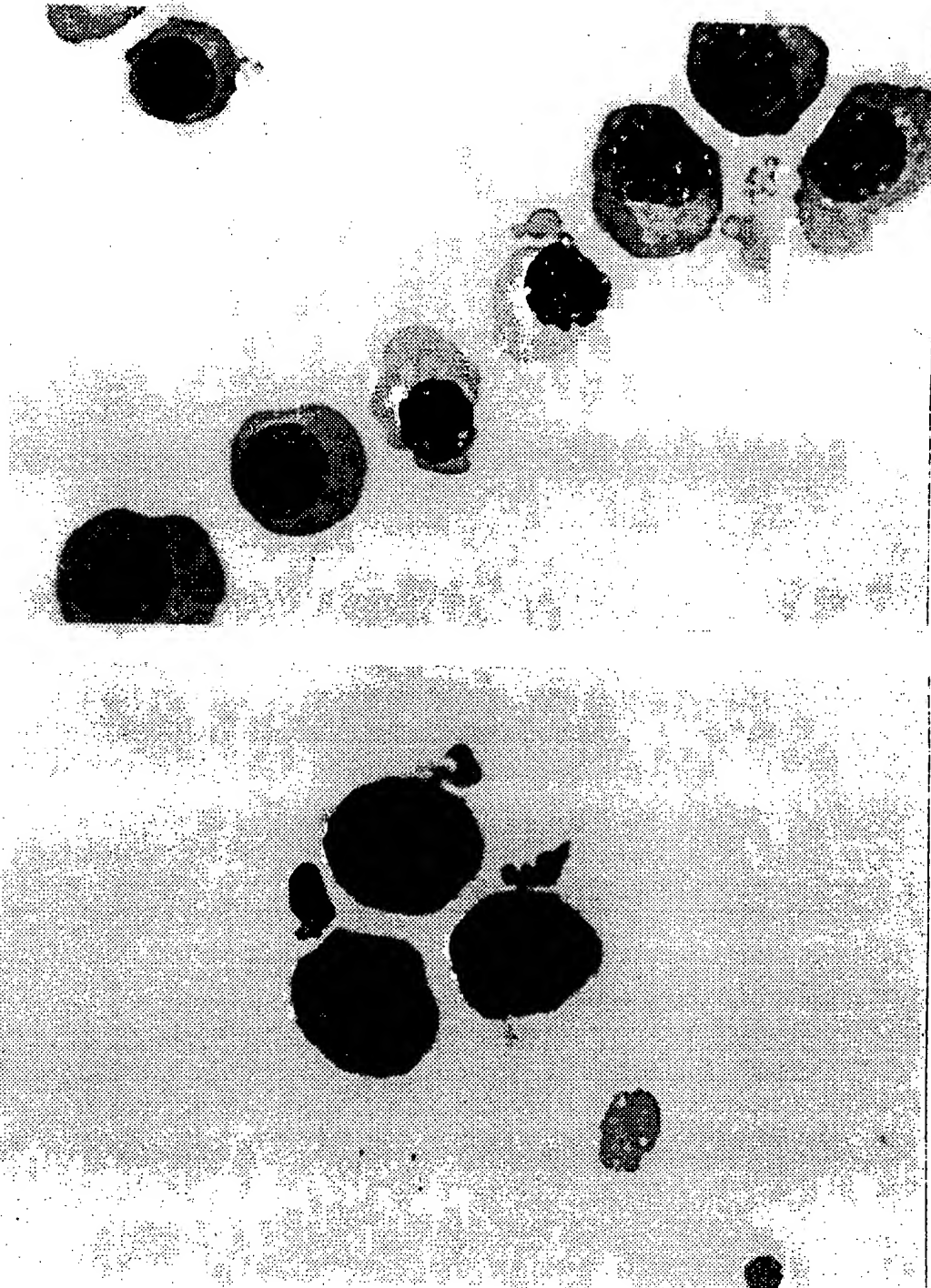
12/13

図 12



13/13

図 13



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00687

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> C12N5/10, C12N15/62, C07K19/00, C07K14/715, C07K14/72

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> C12N5/10, C12N15/62, C07K19/00, C07K14/715, C07K14/72

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Peter J. et al. "Hormone-conditional transformation by fusion proteins of c-Abl and its transforming variants" EMBO J. (1993) Vol. 12, No. 7, p. 2809-2819	1 - 17
A	Nagata S. et al. "Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor" Prog. Growth. Factor Ref. (1991) Vol. 3, p. 131-141	1 - 17
PX	Ito K. et al. "G-CSFR-estrogen-R fusion cDNA as a novel selective amplifier gene for controllable expansion of transduced hematopoietic stem cells" Blood (1996, Dec.) Vol. 88, p. 137A	1 - 17
PX	Ozawa K. et al. "Development of a novel selective amplifier gene for in vivo selective expansion of transduced hematopoietic stem cells" Experimental Hematology (1996, Aug.) Vol. 24, No. 9, p. 1053	1 - 17



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

June 4, 1997 (04. 06. 97)

Date of mailing of the international search report

June 17, 1997 (17. 06. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> C12N5/10, C12N15/62, C07K19/00, C07K14/715, C07K14/72

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> C12N5/10, C12N15/62, C07K19/00, C07K14/715, C07K14/72

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Peter J. et al. "Hormone-conditional transformation by fusion proteins of c-Ab1 and its transforming variants" EMBO J. (1993) 第12巻 第7号 p. 2809-2819	1-17
A	Nagata S. et al. "Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor" Prog. Growth Factor Res. (1991) 第3巻 p. 131-141	1-17
PX	Ito K. et al. "G-CSF-estrogen-R fusion cDNA as a novel selective amplifier gene for controllable expansion of transduced hematopoietic stem cells" Blood (1996, Dec.) 第88巻 p. 137A	1-17
PX	Ozawa K. et al. "Development of a novel selective amplifier gene for in vivo selective expansion of transduced hematopoietic stem cells" Experimental Hematology (1996, Aug.) 第24巻 第9号 p. 1053	1-17

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.06.97

国際調査報告の発送日

17.06.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

平田 和男

印

4 B 9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING  
DOCUMENT TRANSMITTED

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

29 September 1998 (29.09.98)

International application No.

PCT/JP97/00687

International filing date (day/month/year)

05 March 1997 (05.03.97)

Applicant

Dनावेक रीसेअर्च इं. एत अल

The International Bureau transmits herewith the following documents and number thereof:

\_\_\_\_\_ copy of the English translation of the international preliminary examination report (Article 36(3)(a))

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Sean Taylor

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

21  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference D3-803PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP97/00687	International filing date (day/month/year) 05 March 1997 (05.03.1997)	Priority date (day/month/year) 05 March 1996 (05.03.1996)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 5/10, C12N15/62, C07K 19/00, C07K14/715, C07K14/72		
Applicant DNAVEC RESEARCH INC.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 28 August 1997 (28.08.1997)	Date of completion of this report 04 December 1997 (04.12.1997)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP97/00687

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☒ the international application as originally filed.
- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_, as originally filed,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_, as originally filed,  
 Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_, as originally filed,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP97/00687

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-17	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-17	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-17	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

The inventions of claims 1-17 are neither disclosed in any of the documents cited in the ISR nor obvious to a person skilled in the art.

09/142305 5610

PCT/JP97/00687

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing</b> (day/month/year) 26 September 1997 (26.09.97)	
<b>International application No.</b> PCT/JP97/00687	<b>Applicant's or agent's file reference</b> D3-803PCT
<b>International filing date</b> (day/month/year) 05 March 1997 (05.03.97)	<b>Priority date</b> (day/month/year) 05 March 1996 (05.03.96)
<b>Applicant</b> OZAWA, Keiya et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
28 August 1997 (28.08.97)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

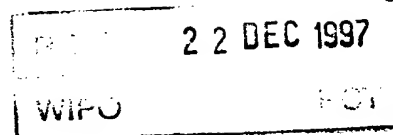
K. Takeda

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]



出願人又は代理人 の書類記号 D3-803PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP97/00687	国際出願日 (日.月.年) 05.03.97	優先日 (日.月.年) 05.03.96
国際特許分類(IPC) Int.Cl <sup>6</sup> C12N5/10, C12N15/62, C07K19/00, C07K14/715, C07K14/72		
出願人(氏名又は名称) 株式会社ディナベック研究所		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
  - II ☐ 優先権
  - III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
  - IV ☐ 発明の単一性の欠如
  - V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
  - VI ☐ ある種の引用文献
  - VII ☐ 国際出願の不備
  - VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 28.08.97	国際予備審査報告を作成した日 04.12.97	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 平田 和男	4B 9549
電話番号 03-3581-1101 内線 3449		

## 1. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とする)

☒ 出願時の国際出願書類

- |                                |                |                      |
|--------------------------------|----------------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書   | 第 _____ ページ、   | 出願時のもの               |
| <input type="checkbox"/> 明細書   | 第 _____ ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書   | 第 _____ ページ、   | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書   | 第 _____ ページ、   | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、     | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、     | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、     | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、     | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、     | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面    | 第 _____ ページ/図、 | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 図面    | 第 _____ ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面    | 第 _____ ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面    | 第 _____ ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 補正により、下記の書類が削除された。

- |                                |               |
|--------------------------------|---------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書   | 第 _____ ページ   |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項     |
| <input type="checkbox"/> 図面    | 第 _____ ページ/図 |

3. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

4. 追加の意見(必要ならば)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性（N）	請求の範囲	1-17	有
	請求の範囲		無
進歩性（IS）	請求の範囲	1-17	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性（IA）	請求の範囲	1-17	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明

請求の範囲1-17に記載された発明は、国際調査報告で列記されたいずれの文献にも記載されておらず、また、当業者によって自明なものでもない。

## 国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)  
〔PCT 18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 D3-803PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP97/00687	国際出願日 (日.月.年) 05.03.97	優先日 (日.月.年) 05.03.96
出願人(氏名又は名称) 株式会社ディナベック研究所		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT 18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。
2. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。
3. ☐ この国際出願は、ヌクレオチド及び／又はアミノ酸配列リストを含んでおり、次の配列リストに基づき国際調査を行った。
  - ☐ この国際出願と共に提出されたもの
  - ☐ 出願人がこの国際出願とは別に提出したもの
    - ☐ しかし、出願時の国際出願の開示の範囲を越える事項を含まない旨を記載した書面が添付されていない
  - ☐ この国際調査機関が書換えたもの
4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。  
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。  
 \_\_\_\_\_
5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。  
☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。
6. 要約書とともに公表される図は、  
 第\_\_\_図とする。☐ 出願人が示したとおりである。 ☒ なし  
☐ 出願人は図を示さなかった。  
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N5/10, C12N15/62, C07K19/00, C07K14/715, C07K14/72

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N5/10, C12N15/62, C07K19/00, C07K14/715, C07K14/72

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Peter J. et al. "Hormone-conditional transformation by fusion proteins of c-Ab1 and its transforming variants" EMBO J. (1993) 第12巻 第7号 p. 2809-2819	1-17
A	Nagata S. et al. "Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor" Prog. Growth. Factor Res. (1991) 第3巻 p. 131-141	1-17
PX	Ito K. et al. "G-CSFR-estrogen-R fusion cDNA as a novel selective amplifier gene for controllable expansion of transduced hematopoietic stem cells" Blood (1996, Dec.) 第88巻 p. 137A	1-17
PX	Ozawa K. et al. "Development of a novel selective amplifier gene for in vivo selective expansion of transduced hematopoietic stem cells" Experimental Hematology (1996, Aug.) 第24巻 第9号 p. 1053	1-17

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.06.97

国際調査報告の発送日

17.06.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

平田 和男

4B

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3449





P.B.5818 - Patentlaan 2  
2280 HV Rijswijk (ZH)  
☎ +31 70 340 2040  
TX 31651 epo nl  
FAX +31 70 340 3016

**Europäisches  
Patentamt**

Zweigstelle  
in Den Haag  
Recherchen-  
abteilung

**European  
Patent Office**

Branch at  
The Hague  
Search  
division

**Office européen  
des brevets**

Département à  
La Haye  
Division de la  
recherche

VOSSIUS & PARTNER  
Siebertstrasse 4  
81675 München  
ALLEMAGNE

**EINGEGANGEN**  
Vossius & Partner

12. Aug. 2002

Frist  
bearb.:

Datum/Date

12.08.02

Zeichen/Ref./Réf.

C 2319 EP

Anmeldung Nr./Application No./Demande n°/Patent Nr./Patent No./Brevet n°.

97906838.4-2403-JP9700687

Anmelder/Applicant/Demandeur/Patentinhaber/Proprietor/Titulaire

Dnavec Research Inc.

## COMMUNICATION

The European Patent Office herewith transmits as an enclosure the European search report for the above-mentioned European patent application.

If applicable, copies of the documents cited in the European search report are attached.

☒ Additional set(s) of copies of the documents cited in the European search report is (are) enclosed as well.

## REFUND OF THE SEARCH FEE

If applicable under Article 10 Rules relating to fees, a separate communication from the Receiving Section on the refund of the search fee will be sent later.





European Patent  
Office

**SUPPLEMENTARY  
EUROPEAN SEARCH REPORT**

Application Number  
EP 97 90 6838

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT					
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.6)		
A	CHAN C-H ET AL: "A MURINE CYTOKINE FUSION TOXIN SPECIFICALLY TARGETING THE MURINE GRANULOCYTE-MACROPHAGE COLONY-STIMULATING FACTOR (GM-CSF) RECEPTOR ON NORMAL COMMITTED BONE MARROW PROGENITOR CELLS AND GM-CSF- DEPENDENT TUMOR CELLS" BLOOD, W.B. SAUNDERS, PHILADELPHIA, VA, US, vol. 86, no. 7, 1 October 1995 (1995-10-01), pages 2732-2740, XP000611396 ISSN: 0006-4971 * the whole document *	1-15	C12N5/10 C12N15/62 C07K19/00 C07K14/715 C07K14/72		
A	WILLIAMS D E ET AL: "HEMATOPOIETIC EFFECTS OF A GRANULOCYTE-MACROPHAGE COLONY-STIMULATING FACTOR INTERLEUKIN-3 FUSION PROTEIN" CANCER (PHILADELPHIA), vol. 67, no. 10 SUPPL., 1991, pages 2705-2707, XP002206890 ISSN: 0008-543X * the whole document *	1-15	<table border="1"><thead><tr><th>TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.6)</th></tr></thead><tbody><tr><td>C12N</td></tr></tbody></table>	TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.6)	C12N
TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.6)					
C12N					
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.					
Place of search <b>MUNICH</b>		Date of completion of the search <b>19 July 2002</b>	Examiner <b>Vix, O</b>		
<table><tr><td><b>CATEGORY OF CITED DOCUMENTS</b> X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document</td><td>T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons &amp; : member of the same patent family, corresponding document</td></tr></table>				<b>CATEGORY OF CITED DOCUMENTS</b> X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document	T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document
<b>CATEGORY OF CITED DOCUMENTS</b> X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document	T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document				